

25X1

Page Denied

OFFICE INTERNATIONAL
DES ÉPIZOOTIES

Extrait du
*Bulletin de l'Office international
des Epizooties*
T. 45, n° 5-6, Mai Juin 1956, p. 364

**Utilisation du microscope électronique
pour les investigations microbiologiques
concernant les bactéries pathogènes**

par

Joseph PARNAS
(Pologne)

Le microscope électronique rend de grands services pour les recherches microbiologiques. Grâce à l'application de ce mode d'investigation, nous avons pu obtenir des résultats intéressants, dont je désire présenter ici un court résumé.

Nous avons pu réaliser nos recherches grâce à l'aide bienveillante du Laboratoire du Microscope électronique de l'Institut d'Hygiène d'Etat à Varsovie (A. Feltynowski) et du Laboratoire du Microscope électronique de la Faculté de médecine de l'Université Masaryk, à Brno (professeur D^r Hercik).

Virus de la grippe des porcs. (Voir Fig. I et II.)

Le virus de la grippe des porcs cause, chez les animaux de l'espèce porcine, de fréquentes maladies et de grandes pertes à l'élevage. Après trois années de travail, Z. Lorkiewicz et J. Parnas réussirent à isoler de matériaux contaminés le « virus pneumotrope », dénommé « G₁ ». Le virus est pathogène pour les souris blanches et les porcelets et provoque des broncho-pneumonies. Le virus G₁ se rapproche sérologiquement des virus de Harnach (C. S. R.) et du virus de Shope (U. S. A.). Le virus G₁ peut être mis en évidence dans les tissus pulmonaires et dans les sécrétions gutturo-nasales à l'aide de la réaction de l'hémagglutination et de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination. Le virus G₁ interfère faiblement le virus de la grippe des hommes (A, A₁ et B).

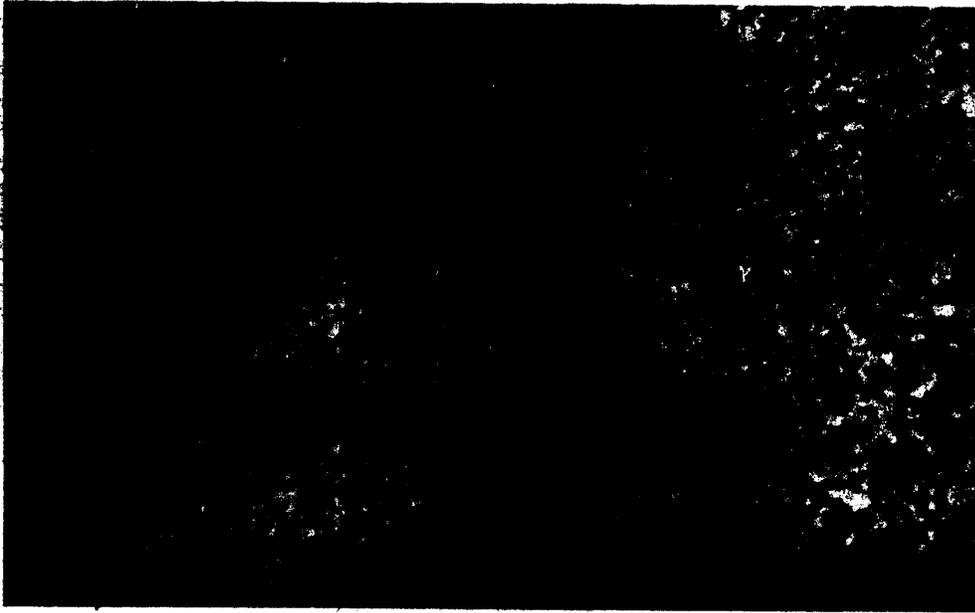
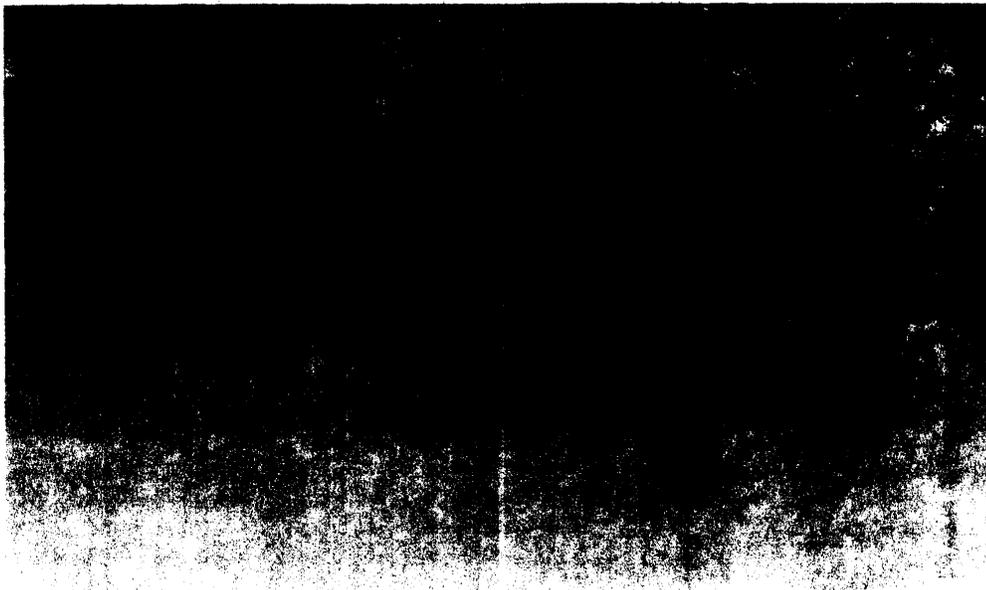


Fig. 1. — Virus de la grippe porcine G 1. Gross. 15.600 (A. FELTYNOWSKI et J. PARNAS).

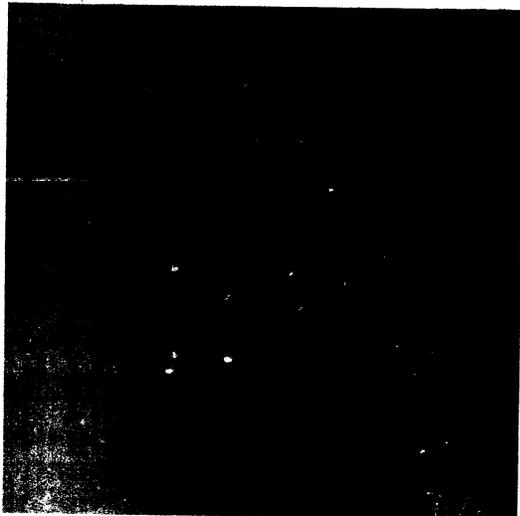


Les recherches suivantes démontreront la possibilité d'application du virus G, pour les vaccinations contre la grippe des porcs.

Virus-phage E. Coli et Corynebacterium equi.
(V. Fig. III, IV, V, VI, VII, VIII.)

En faisant des recherches sur *E. Coli*, qui est la cause de maladies chez les jeunes animaux, et sur *Corynebacterium equi*, nous avons démontré l'existence de phages. Les essais d'utilisation des phages pour déterminer ces souches et soigner les infections furent positifs. Les photographies ci-jointes illustrent

la morphologie de ces virus bactériens et leur rapport avec les cellules bactériennes. A l'aide du microscope électronique, on révéla aussi des capsules chez *Corynebacterium equi*.



Escherichia Coli porcellorum avec les phages. Gross. 40.000
(HERCIX ET PARNAS).

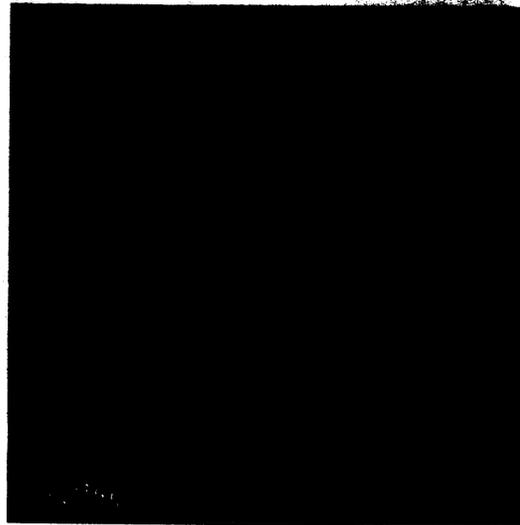


Fig. 4. — Les phages de *Corynebacterium equi*. Gross. 45.000 (HERCIX ET PARNAS).

— 6 —

— 7 —

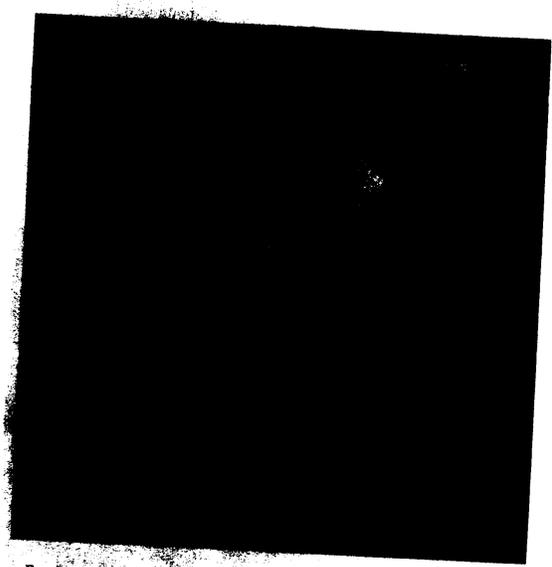


FIG. 5. — *Mycobact. equi* (*Corynebact. equi*) avec les phages. Gross. 39.000
(HERCIK et PARNAS.)

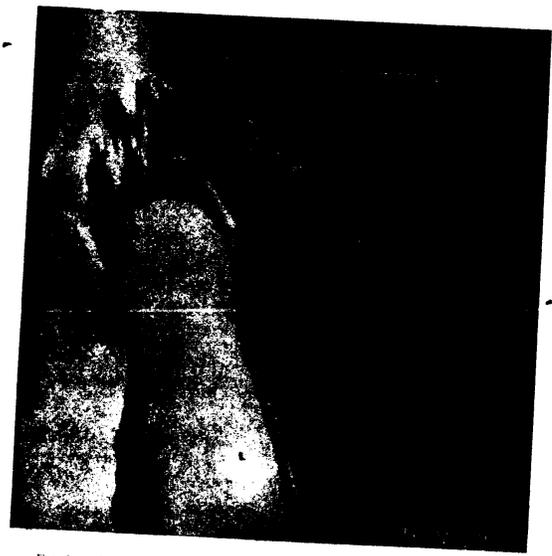


FIG. 6. — *Mycobact. equi* (*Corynebact. equi*) avec les phages. Gross. 11.000
(HERCIK et PARNAS.)



Fig. 7. — *Corynebact. equitrullis* avec les phages. Gross. 40.000 (HERCIEK et PARNAS).

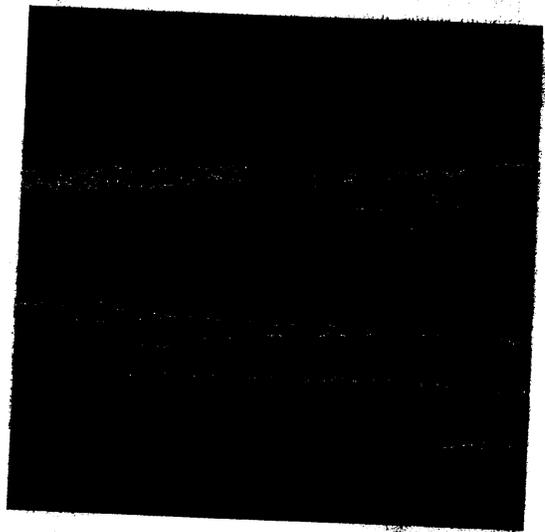


Fig. 8. — *Corynebact. equi* avec les phages. Gross. 32.000.

Bactéries de l'espèce Corynebacterium chez les animaux et les hommes. (Voir Fig. IX, X, XI.)

Les bactéries de cette espèce jouent un si grand rôle dans la pathogénèse des maladies des jeunes animaux, ainsi que des animaux adultes, que la nécessité se présente d'y attacher dans l'avenir plus d'importance que jusqu'à présent. Nos travaux ont trait aux bactéries des souches isolées de différentes espèces humaines et animales. Les photographies représentent les différences morphologiques entre les espèces de *Corynebacterium*.



Fig. 9. — *Corynebacterium ppogenes suis*. Gross. 23.000 (HERCIX et PARNAS).

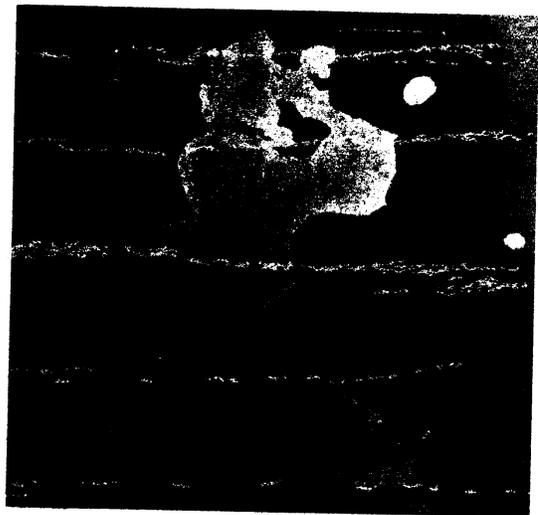


Fig. 10. — *Corynebacterium pseudo-tuberculosis*. Gross. 24.000 (HERCIX et PARNAS).

Pasteurella multocida tuberosa et rodentium
(Voir Fig. XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII.)

Les bâtonnets sont plus courts que ceux de *Pasteurella*
de la systématique bactériologique.
au microscope électronique.
forme entre *Pasteurella*

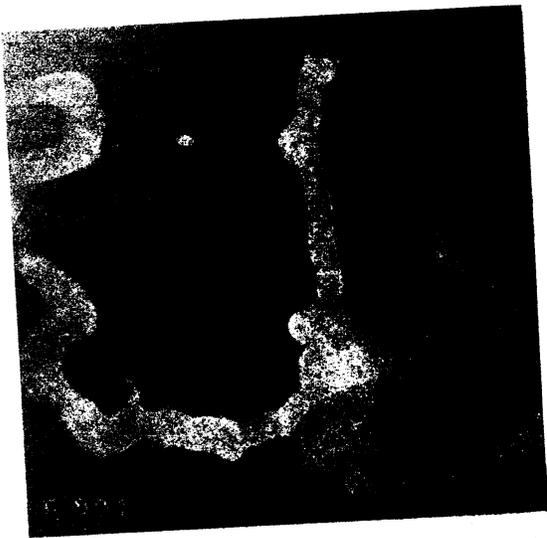


FIG. 11. — *Corynebacterium pyogenes equi* (Gross. 24.000)

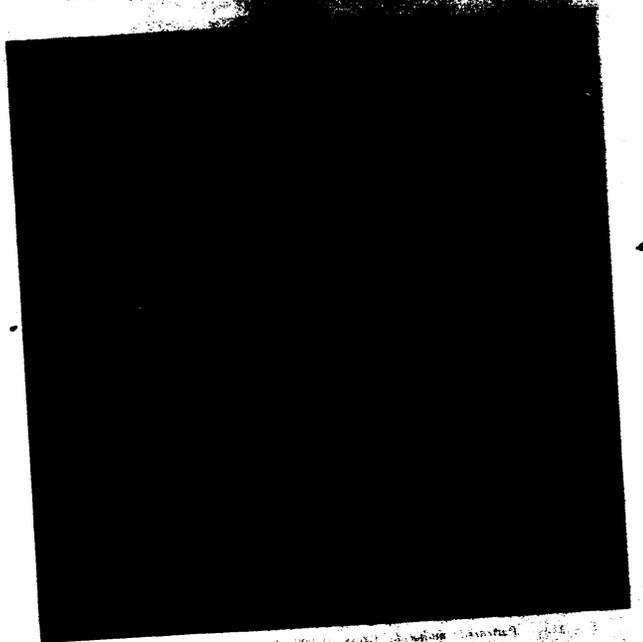


FIG. 12. — *Pasteurella multocida* (Gross. 12.000)
(A. FERNANDEZ et J. FERNANDEZ)

Pasteurella tularensis occupe ici une place à part (les capsules sont délicates) Nous avons aussi profité du microscope électronique pour connaître l'influence des ultrasons sur la morphologie de *Pasteurella tularensis*. Nous le voyons sur les photographies ci-jointes (destruction complète des bactéries).



FIG. 13. — *Pasteurella multocida*. Gross. 18,000 (A. FELTYNOWSKI et J. PARNIS).

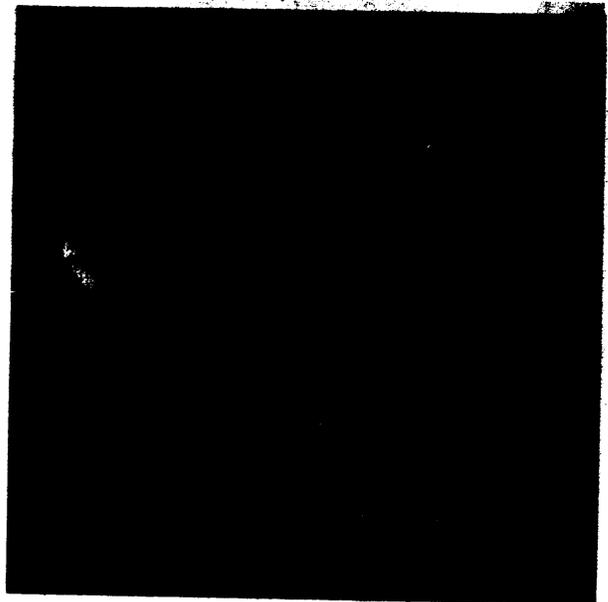


FIG. 14. — *Pasteurella tularensis* (capsules). Gross. 18,000 (A. FELTYNOWSKI et J. PARNIS).

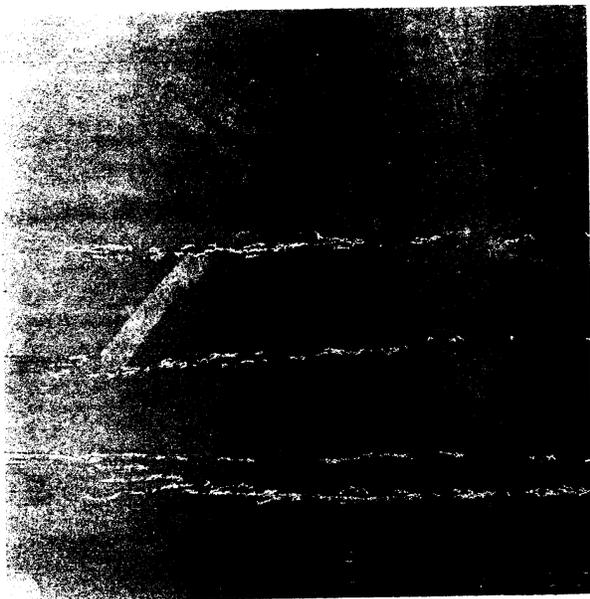


Fig. 15. — *Pasteurella pseudo-tuberculosis rodentium*. Gross. 18,000
(A. FELTYNOWSKI et J. PARNAS).

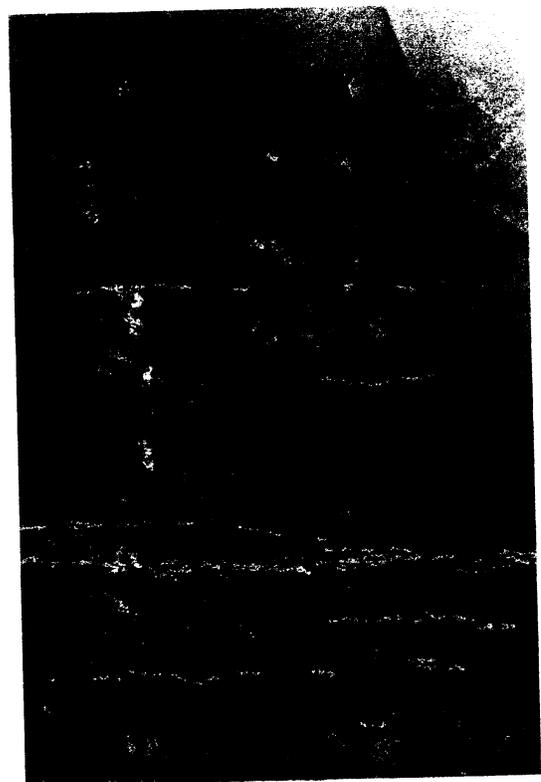


Fig. 16. — *Pasteurella buccarum*. Gross. 18,000 (A. FELTYNOWSKI et J. PARNAS).

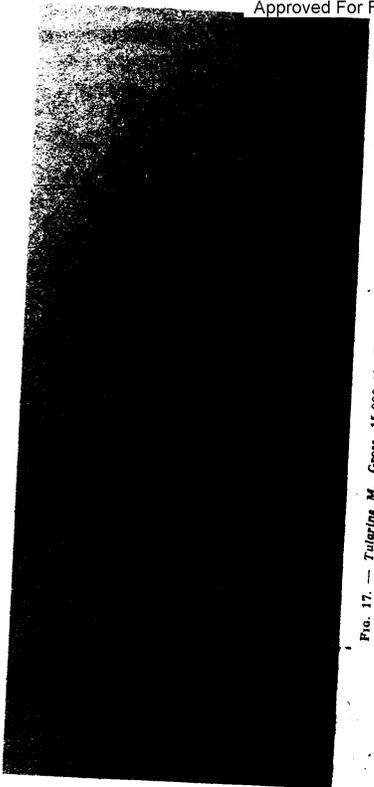


FIG. 17. — *Pasteurella tularensis*, Gross. 15.000 (A. FELTYNOWSKI et J. PARNAS).

Brucella brucei. (Voir Fig. XVIII, XIX.)
Nos recherches au microscope électronique montrent une forme très caractéristique des bactéries, définies sous le nom de *Brucella brucei*. Les bactéries ne possèdent pas de capsules. Leurs formes diffèrent de celles de *Pasteurella tularensis* et *Pasteurella multocida*. Sous l'influence des ultrasons, les

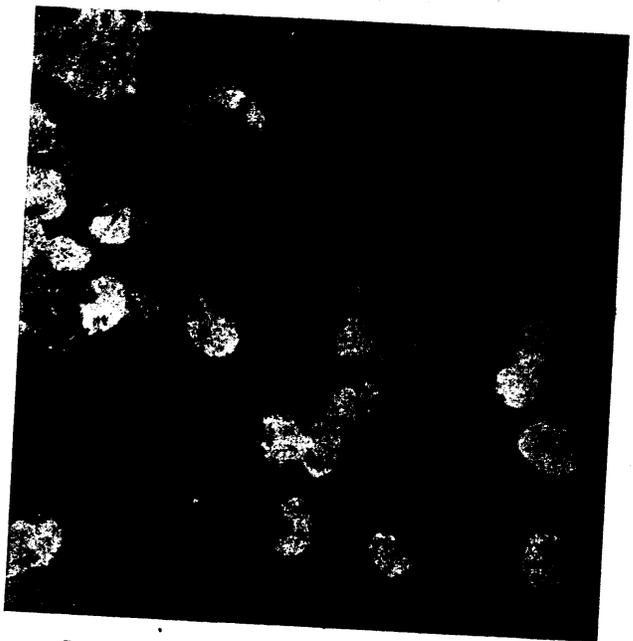


FIG. 18. — *Brucella brucei*, Gross. 15.000 (A. FELTYNOWSKI et J. PARNAS).

— 20 —

bactéries sont détruites. C'est un phénomène très avantageux pour l'obtention du produit allergène, la brucelline PD. La brucelline PD a été approuvée pour l'usage du Service de la Santé publique comme allergène de différenciation. Nous l'appliquons aussi en médecine vétérinaire comme allergène servant au diagnostic de la brucellose comparativement aux réactions sérologiques. La brucelline PD est également appliquée comme vaccin curatif dans la brucellose humaine.

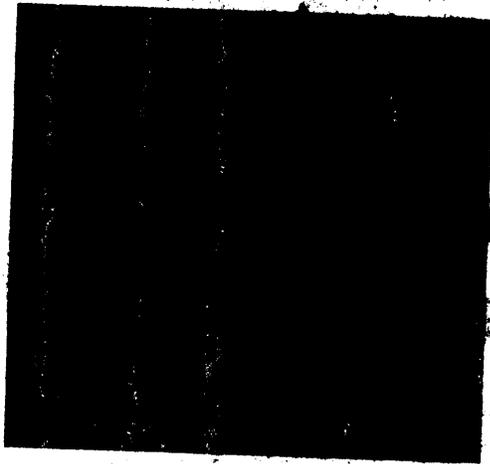


FIG. 19. — Brucelline PD; Gross. 14.700
(A. FELTYNOWSKI et J. PARNAS).

Nouvelles recherches sur la variabilité des *Brucella* *

Jozef PARNAS et Regina KOZAKOWNA

(Chaire de Microbiologie de l'Académie de Médecine et Section des Anthropozoonoses de l'Institut d'Etat de Médecine du Travail et de l'Hygiène Rurale à Lublin, Pologne. Directeur : Prof. Dr J. PARNAS)

1. — Introduction

A.A. CHODKOWSKI, J. PARNAS et H. HRYNIEWICZ décrivent, dans « Recherches concernant les *Brucella* isolées en Pologne, étudiées particulièrement sous l'angle des variétés », (1955, Ann. UMCSS, DD, V. 1, str 1), les méthodes qu'ils appliquaient pour l'étude des variétés de *Brucella*. Voici les résultats de l'examen de 123 souches indigènes : 108 (89,25%) étaient des souches atypiques de la variété *abortus*, 5 (4%) étaient des souches typiques *suis*, 1 (0,82%) était une souche typique *melitensis*, 9 (7,43%) étaient des souches intermédiaires. En prenant en considération seulement les épreuves biochimiques, il y avait 17 souches typiques *suis*, aucune souche *melitensis* et 2 souches intermédiaires. Parmi 10 souches de la variété *abortus*, déterminées par l'ensemble des méthodes, 33 (30%) seulement exigeaient pour la croissance une atmosphère enrichie en CO₂ — c'étaient celles qui avaient été repiquées à plusieurs reprises pendant nombre de mois. Deux souches ne produisaient point de H₂S, tandis que 4 le produisaient en moins de 5 jours. Onze souches *abortus* décomposaient l'urée en moins de 20 minutes, elles se comportaient donc comme la variété *suis*, de ce point de vue. Deux souches de la variété *suis* produisaient du H₂S en moins de 4 jours. Une variété *melitensis* produisait du H₂S pendant 5 jours, une variété intermédiaire et non typique *melitensis* rapprochée de la variété *abortus* produisait également du H₂S pendant 5 jours. Du point de vue bactériologique, parmi 103 souches de la variété *abortus*, toutes se comportaient normalement sur les milieux bactériostatiques. Nous avons surtout observé la souche N° 103, classée comme *intermedia*, qui, du point de vue bactériostatique, se comportait comme une souche typique *abortus*, tandis

*Travail financé par le Comité Microbiologique de l'Académie Polonaise des Sciences, Varsovie.

que du point de vue sérologique, elle se comportait comme la variété *melitensis*. Cinq souches de la variété *suis* se comportaient au point de vue bactériostatique normalement c'est-à-dire qu'elles se développaient sur la thionine; la souche N° 33, classée définitivement comme intermédiaire, était inhibée dans sa croissance par la thionine, ce qui a lieu chez les souches danoises-européennes de la variété *suis*.

L'identification des souches isolées des fœtus du bétail en Pologne, soit deux souches de *Brucella* var. *melitensis*, sept souches de la variété *suis*, et deux souches de la variété *suis* isolées de porc, mérite une attention spéciale, comme un phénomène épizootique et épidémiologique important.

Le travail suivant de A. CHODKOWSKI, J. PARNAS et Z. ZMI-GRODZKI (1956 - Med. Desw. i Mikrob. - sous presse) contenait les résultats de recherches ultérieures sur les *Brucella* apparaissant en Pologne. Ces investigations concernaient 39 souches nouvelles de *Brucella* et, en comparaison totale, on obtint des résultats qui peuvent être exprimés de la manière suivante :

Sur 39 souches examinées, nous constatâmes 18 souches de la variété *abortus* typiques, 6 souches *abortus* atypiques, 10 souches de la variété *suis* typique, 4 souches *suis* atypiques, 1 souche *melitensis* atypique.

En comparaison totale avec nos recherches antérieures, nous avons obtenu les résultats suivants :

Sur 164 souches isolées en Pologne depuis 1952-1957, on constata,

- 127 souches typiques de la variété *abortus*,
- 11 souches atypiques de la variété *abortus*,
- 14 souches typiques de la variété *suis*,
- 9 souches atypiques de la variété *suis*,
- 1 souche typique de la variété *melitensis*,
- 2 souches atypiques de la variété *melitensis*.

TABLEAU I

Souches indigènes et étrangères caractérisées.

Provenance de la souche	Br. abortus			Br. suis			Br. melitensis			Ensemble		
	typ	atyp	total	typ	atyp	total	typ	atyp	total	typ	atyp	total
Indigènes	127	11	138	14	9	23	1	2	3	142	22	164
Etrangères	6	1	9	7	1	8	3	—	3	18	2	20
Total	135	12	147	21	10	31	4	2	6	160	24	184

VARIABILITÉ DES BRUCELLA

181

Dans ce travail, nous désirons présenter les résultats des investigations de 12 nouvelles souches de *Brucella* isolées en Pologne, et discuter la question de la variabilité des signes distinctifs biochimiques, bactériologiques, sérologiques, qui à présent sont sujets d'intéressantes investigations menées par les centres de l'O. M. S. (RENOUX, ROUX). Nous faisons de même des recherches analogues. Nous présentons aussi les résultats des recherches expérimentales concernant les phages.

2. — Matériel expérimental et méthodes

Le matériel des recherches expérimentales est constitué par notre collection indigène de souches de *Brucella* ainsi que par les souches de références utilisées par les laboratoires de l'O. M. S. Nous avons obtenu des souches indigènes de presque tous les Instituts d'Hygiène Vétérinaire à Pulawy et nous les remercions pour l'aide qu'ils nous ont accordée.

La méthode de la définition des variétés de *Brucella* est fondée sur les épreuves biochimiques (H₂S, CO₂, uréase), bactériostatiques (thionine, fuchsine basique) ainsi que sur l'analyse des récepteurs avec l'usage des sérums monospécifiques anti-*abortus-suis*, anti-*melitensis*. La méthode bactériostatique sur plaques de gélose élaborée par A. CHODKOWSKI a été améliorée ultérieurement de la manière suivante : à la surface de l'agar, dans lequel plongent deux bandes de papier filtre imprégné de thionine (1/800), on place les échantillons de *Brucella* comme suit: en commençant d'en haut une anse (2 mm) plongée dans une suspension de la souche *Br. melitensis* M 16 (à la concentration de 100 millions par ml) nous passons une ligne verticale à la surface de l'agar quatre fois. On introduit de cette façon à peu près 2.500.000 cellules bactériennes. Au-dessous de cette ligne d'ensemencement, on fait la même chose avec la souche de la variété *suis* 1330. au-dessous de cette ligne, on ensemence de la même manière la souche de la variété *abortus* 544. Entre ces lignes d'ensemencement, la distance est de 10 mm. Les souches *melitensis*, *suis* et *abortus* jouent un rôle de contrôle. Puisque la souche n° 544 se développe seulement en atmosphère de CO₂ toutes les boîtes sont gardées à l'étuve dans un air contenant 10% de CO₂ pendant 5 jours. Au-dessous de ces ensemencements de contrôle, on place à la surface de l'agar et de la même manière, le matériel de la souche examinée. L'examen des souches étudiées est effectué par des lignes parallèles, en employant pour la première ligne de l'ensemencement une dilution de 1 milliard par ml, pour la deuxième ligne une dilution de 100 millions de bactéries dans 1 ml, ensuite sans replonger l'anse dans la suspension de la souche on effectue la 3^e et la 4^e ligne d'ensemencement avec cette même anse, en la passant à la surface de la ligne quatre fois dans les deux directions. Cette uniformisation de la méthode fut trouvée utile. La méthode de nos recher-

ARCHIVES DE L'INSTITUT PASTEUR DE TUNIS

ches expérimentales concernant la variabilité des *Brucella* est relatée plus loin.

3. — Résultats des épreuves

Les examens de 12 souches sont représentés sur le tableau n° II.

Les souches N° 220/3837, 223/4082, 225/260 A, 226/261 D, 227/387/99, 228/1935, 230/254/57 se comportent d'une manière typique sous tous les rapports comme *Brucella brucei* var. *abortus*. Toutes se développent sans addition de CO₂, ce qui n'est pas, bien entendu, un trait caractéristique de la var. *abortus* et paraît être chez les souches de cette variété sous l'influence d'enzymes d'adaptation correspondants. Toutes les souches de la variété *abortus* énumérées ici produisent du H₂S pendant 7 jours à l'exception de la souche N° 225/260 A et 228/1935 qui ne produisent pas de H₂S. Ceci est déjà une certaine déviation de la règle, adoptée par nous d'après HUDDLESON dans la sphère de biochimie de la variété *abortus*. Toutefois comme les autres particularités prédominent nous les classons parmi les souches typiques. L'activité de l'uréase évaluée en minutes (du moment de l'observation de l'épreuve jusqu'à l'apparition d'une couleur rose) s'élève de 20 à 78.

Les souches de la variété *abortus* atypiques sont intéressantes dans cette épreuve. La souche N° 219/1419 se développe non seulement sur la fuchsine, mais partiellement aussi sur la thionine et peut agglutiner partiellement avec le sérum monospécifique anti-melitensis. La souche N° 221/4096 se comporte pareillement pendant l'analyse des récepteurs. Ce phénomène est encore plus marqué chez la souche 222/141/A. La souche 224/4010 se comporte sous le rapport des particularités bactériostatiques comme la variété *melitensis* et est agglutinée par le sérum monospécifique anti-melitensis au titre 1/25. La souche N° 229/253/57 se comporte d'une manière plus atypique encore, elle se développe sur la fuchsine et la thionine et est agglutinée par le sérum monospécifique anti-melitensis au titre de 1/50; nous l'avons déterminée comme variété intermédiaire (var. *intermedia*).

4. — Souches sérologiquement bi-recepteurs

Nous désirons mentionner que nous avons réussi à provoquer expérimentalement la transformation antigène sérologique des souches de *Brucella*. Ce fait confirme les observations faites pendant la détermination des souches du terrain. L'épreuve fut faite de la manière suivante : 3 souches modèles furent soumises à l'agglutination avec les sérums anti-*abortus-suis* et anti-melitensis, ce qui représente le tableau III ci-dessous.

VARIABILITÉ DES BRUCELLA

183

TABLEAU III

N° de la Souche	Br. brucei	Sérum	Sérum
		anti melitensis	anti abortus
106	var. melitensis	1/400 ++	1/50 +
24	var. abortus	1/50 +	1/400 ++
81	var. suis	1/50 +	1/400 ++

Nous voyons que ces souches se comportent d'une manière typique dans l'analyse des récepteurs. Ensuite ces souches furent transformées en substrats morts sur lesquels on cultivait les mêmes souches-types.

Après nombre de passages sur des substrats hétérologues, on obtint 10 nouvelles souches, avec lesquelles on effectua la réaction d'agglutination en employant les sérums monospécifiques anti-*abortus-suis* et anti-*melitensis*. L'agglutination fut faite avec les souches vivantes et les mêmes souches tuées par le chauffage. Toutes ces dix souches, à l'exception de la souche 1 sont également agglutinées, au titre 1/400, par les deux sérums monospécifiques.

On voit donc qu'à la suite de certaines transformations antigéniques sérologiques nous avons obtenu des souches nouvelles, caractérisées par leur agglutination dans les deux sérums monospécifiques (à l'exception de la souche N° 1).

5. — La variabilité des souches de référence

Il faut consacrer quelques mots à deux souches de référence de la variété *abortus* N° 544. Nous avons reçu cette souche très virulente du Centre de Weybridge en 1952. Nous l'avons donné à l'Institut Vétérinaire de Pulawy et l'avons reprise récemment. En comparant ces deux souches N° 544 nous voyons certaines différences : la souche conservée à Pulawy, lyophilisée, avait conservé jusqu'à un certain degré les particularités caractéristiques de la variété, cependant qu'elle se développe très bien sur la thionine. Se basant sur ces faits, nous sommes donc obligés de la classer parmi les souches atypiques. Cependant, la souche N° 544 conservée sur l'agar (nous possédons aussi des souches lyophilisées) ne produit pas de H₂S, ne démontre pas d'uréase : elle se comporte d'une manière typique envers les colorants; nous la classons donc également comme souche atypique.

6. — Analyse des souches déterminées comme variétés atypiques ou intermédiaires avec considération d'épreuves expérimentales

Nous désirons souligner cette question comme très importante du point de vue théorique (génétique) de même que du point de vue pratique (épizootologique et épidémiologique).

C'est pourquoi nous consacrons à cette question quelques données de la littérature concernant les épreuves tendant à la transformation expérimentale des propriétés biochimiques, bactériostatiques et sérologiques (antigènes) des variétés respectives de *Brucella*.

FRENDZLOWA et SZYMANOWSKI (1930) cultivaient les *Brucella* dans des filtrats de *S. typhi*. Après un certain temps, la souche de *Brucella* montrait une diminution du titre d'agglutination avec le sérum homologue. De nombreuses souches de *Brucella* étaient cultivées pendant de longs passages sur le substrat filtré *S. typhi*; parmi elles, une souche de *Brucella* démontra l'aptitude à être agglutinée par le sérum anti *S. typhi*, au titre 1/2560. La souche ne perdit pas cette particularité au cours de longues séries de repiquages.

RYDZAK et PARNAS (1944, 1957) faisaient de longs passages des *Brucella* sur un substrat composé d'une culture de *Proteus* OX 19 tuée par un chauffage délicat et cultivaient inversement les souches de *Proteus* OX 19 sur un milieu d'une culture tuée de *Brucella*. Ces épreuves aboutirent au fait que les souches de *Brucella* ainsi cultivées commencèrent à montrer une agglutination amoindrie sous l'influence du sérum homologue anti-*brucella* et une agglutination augmentée envers le sérum hétérologue anti-*Proteus* OX 19. La même chose fut observée avec les souches de *Proteus* OX 19, cultivées sur substrat de *Brucella*, en relation avec les sérums homologues et hétérologues.

RYDZAK (1946) démontra que les souches de *Brucella* et *Proteus* OX 19 cultivées de cette manière sur les substrats hétérologues se comportent dans la réaction allergique cutanée de BURNET de la manière suivante : la souche *Proteus* OX 19 acquiert des propriétés allergènes, provoquant chez les lapins sensibilisés à l'allergène brucellique des réactions positives spécifiques, quoique moins intenses que la souche de *Brucella* au départ. La souche *Proteus* OX 19 ne montre pas ce trait caractéristique.

LISBONNE, ROMAN et SEIGNEURIN (6) démontrèrent l'inconstance des variétés de *Brucella* dans la conception de HUDDLESON, dans des expériences de parabiose. Les souches de *Brucella* de la variété *melitensis* et *abortus*, cultivées dans les tubes d'ASZESZOW, séparés par une couche de collodion furent changées : la variété *melitensis* ne possédant normalement pas l'aptitude de produire H₂S acquiert de cette manière ces particularités, les adoptant sous l'influence de la variété *abortus* qui se caractérise par une production importante de H₂S. La variété *abortus*, cependant, sous l'influence de la variété *melitensis* perd la faculté de produire H₂S et commence à se développer très bien sur la thionine, ce qui n'a pas lieu normalement.

WILSON et EVANS (13)* observèrent une fois la transition de la transplantation de la variété *melitensis* sur une vache. Ils ne réussirent

rent pas à répéter ce phénomène au cours d'autres épreuves. RENOUX, CARRERE et QUATREFAGES (1952) décrivent des observations analogues : une souche de la variété *abortus* caractéristique par la résistance à la thionine, transplantée sur les moutons démontra une sensibilité à la fuchsine et à la thionine et d'autres particularités, ressemblant à la variété *melitensis*.

WASHKO, BAY, DONHAM et HUTCHINGS (1951)* observèrent que les souches de la variété *abortus*, transplantées sur des porcs, sont sujettes de temps en temps (4 sur 22) à la variabilité dans la direction des particularités de la variété *suis*.

BRAUN et OGLESBY (1) observèrent à l'aide de la méthode du test de fluctuation de LURIA et DELBRUCK, des mutants différents au point de vue biochimique des populations typiques de *Brucella*. Parmi les variétés *abortus* et *suis* apparaissent des mutants spontanés résistants à la thionine et à la fuchsine dans une relation de 6×10^{-10} . La même chose concerne la variabilité des mutants quant à leurs exigences envers le CO₂.

MARR et WILSON (1950)* observèrent de même que les besoins de la croissance du CO₂ de la variété *abortus* dépendent de facteurs génétiques. Le degré de l'apparition des mutants qui se développent bien sans CO₂ était de 2×10^{-10} . Ces mutants peuvent acquérir une domination sur la population du départ aussi bien dans la culture que dans les organismes des animaux de laboratoire.

J. PARNAS (1955) fit l'épreuve suivante : on prit 3 souches des variétés *melitensis*, *suis* et *abortus* qui se comportaient typiquement sous le rapport de la formation du H₂S, de l'activité de l'uréase, de la sensibilité à la thionine et à la fuchsine, ainsi que dans l'analyse des récepteurs, on les transforma en substrats détruits par les ultrasons et tués par un chauffage délicat (56 à 60°C, 30 min.). Ensuite, on cultiva pendant 14 à 25 passages les souches des variétés *suis*, *abortus* et *melitensis*, sur ce genre de substances hétérologues d'autres variétés, contenant les métabolites des cellules détruites de *Brucella*. L'état de destruction était contrôlé au microscope électronique et à l'aide de méthodes biochimiques. Ces épreuves aboutirent au résultat suivant : on réussit à provoquer le changement de certaines propriétés biochimiques et sérologiques des variétés atypiques et intermédiaires, proches par leurs qualités, soit de l'une, soit de l'autre variété-type. Dans le compartiment des particularités biochimiques des variétés on observa la domination des particularités de la variété *suis*. L'analyse des récepteurs permit de constater à l'aide de sérums monospécifiques les particularités des variétés intermédiaires

*Cités d'après G. RENOUX (1955).

RECHERCHES DE L'INSTITUT PASTEUR DE TUNIS

biologiquement biréceptrices. Ces particularités contrôlées durant plusieurs mois, se maintiennent sans grand changement. D'autres essais, effectués par M. WOJTUSZKIEWICZ, A. SKOTNICKA et J. PARNAS (1956) eurent le résultat suivant : *Brucella abortus*, souche 19 fut cultivée pendant 30 passages sur des substrats de bacilles de la tularémie (apparentés aux *Brucella*) ainsi que sur les substrats étrangers au genre *Brucella*, des cellules de *E. coli* β et *E. coli* α .

Les suspensions de *Pasteurella tularensis* (à peu près 20 milliards dans 1 ml), *E. coli* β et *E. coli* α (environ 10 milliards dans 1 ml) furent tuées dans un générateur d'ultrasons à 2.400 kc/sec. 50 min. et une température de 37°C pendant 2 heures. Comme le contrôle au microscope électronique l'a démontré, cela suffit à la destruction complète des bacilles de la tularémie. Probablement, les *E. coli* sont de même détruits dans ces conditions. Les *Brucella* furent cultivées sur de tels substrats pendant 30 passages (la souche de *Brucella* 19). En ensemençant chaque fois la souche 19 du substrat sur l'agar de Braun et de là sur le substrat, on conserve une population pure sous forme smooth. Ensuite on effectua les épreuves biochimiques des souches de départ : *Br. abortus* 19, *Pasteurella tularensis*, *E. coli* α et β ainsi que des souches S 19 cultivées sur 3 substrats métaboliques. Les tableaux N° IV et V présentent le comportement des souches sur le milieu avec les sucres, la production d'indole, de H₂S, l'activité de l'uréase et de la phosphatase ainsi que de la catalase.

TABLEAU IV

SOUCHES	FERMENTATION					Indole	H ₂ S	Phosphatase	Uréase
	Glucose	Galactose	Mannitol	Saccharose	Maltose				
<i>E. coli</i> α	—	—	—	—	—	+	—	—	—
<i>E. coli</i> β	—	—	—	—	—	+	—	—	—
<i>Past. tular.</i>	—	—	—	—	—	—	+	—	3 min.
<i>Brucella abortus</i> 19	—	—	—	—	—	—	+	—	15 min.
19/PT/30	—	—	—	—	—	—	+	—	2 min.
19/ <i>E. coli</i> α /30	—	—	—	—	—	—	+	—	3 min.
19/ <i>E. coli</i> β /30	—	—	—	—	—	—	+	—	3 min.

Nous voyons que la souche *Br. abortus* 19 cultivée sur le substrat de *P. tularensis* démontre une accélération de l'activité de l'uréase (de 15 à 2 minutes) ce qui indiquerait sa ressemblance avec les particularités de *P. tularensis*. Les autres particularités de S 19 ne changèrent pas. On observe la même chose chez les souches S 19/*E. coli* α /30, β /30 qui démontrent une augmentation de l'activité de l'uréase (de 15 minutes à 3 minutes) comme manifestation du changement de cette particularité biochimique vers *P. tularensis*.

VARIABILITÉ DES BRUCELLA

TABLEAU V

SOUCHES	C A T A L A S E					
	Quantité de H ₂ O ₂					
	I	II	III	I	II	III
Contrôle	32,5	32,5	32,5	100 %	100 %	100 %
Brucella Brucei S 19	4,25	4	4	10,30 %	12,30 %	12,30 %
Pt. tularensis	4	3,95	3,75	12,30 %	12,15 %	11,53 %
S 19/E. coli α 30	4	4	3,75	12,30	12,30	11,53
S 19/E. coli β 30	4,1	4	3,75	12,61	12,30	11,53
S 19/P. tular. 30	4	4	3,85	12,30	12,30	11,84

Comme nous le voyons, l'activité de la catalase ne démontre pas de changements chez les souches *Br. abortus* 19 passées sur les milieux hétérologues.

On fit aussi des recherches bactériostatiques, ce qui est représenté sur le tableau N° VI.

TABLEAU VI

	Fuchsine 1/300	1/800	T H I O N I N E			
			1/700	1/600	1/500	1/400
<i>Brucella brucei</i> 19	+	0,75	0,75	0,85	0,85	0,85
<i>Br. brucei</i> var. <i>melitensis</i>	+	+	ces dilutions ne furent pas employées			
<i>Br. brucei</i> var. <i>suis</i>	0,60 cm	+	»	»	»	»
<i>Br. brucei</i> var. <i>abortus</i>	+	0,5	»	»	»	»
<i>E. coli</i> α	+	+	»	»	»	»
<i>E. coli</i> β	+	+	»	»	»	»
S 19/PT/ 30	+	0,15	0,25	0,45	0,25	0,35
S 19/E coli α /30	1,50 cm	0,75	0,75	0,85	0,85	0,85
E 19/E coli β /30	1,50 cm	0,75	0,75	0,85	0,85	0,85

Légende : + culture normale
nombre de cm = zone de l'inhibition.

Ces épreuves démontrent le changement des particularités de la souche 19/PT/30 et des souches, cultivées sur les substrats de *P. tularensis* en relation avec la souche du départ *Br. abortus* 19. Comme nous le savons, la souche 19 ne se développe pas sur la thionine et

ARCHIVES DE L'INSTITUT PASTEUR DE TUNIS

mesure une zone d'arrêt sur la fuchsine (0,40) Les souches cultivées sur les substrats de *P. tularensis* se développaient bien sur la fuchsine (comme les souches virulentes abortus), contrairement aux souches cultivées sur les substrats d'*E. coli* α et β qui démontraient des zones d'inhibition très marquées sur la fuchsine (1,50), les souches *E. coli* α et β ne démontraient pas de zone d'inhibition de la croissance sur la fuchsine.

La souche 19/PT/30 démontrait sur la thionine des zones d'inhibition faibles (0,15, 0,25) contrairement à la souche du départ 19 (0,75, 0,35). Les souches 19/*E. coli* α et β /30 ne montrèrent pas de changement dans les zones d'inhibition relativement à la souche 19. Les résultats de l'analyse sérologique de ces souches avec l'emploi des sérums monospécifiques est représenté sur le tableau N° VII.

TABLEAU VII

Antigène	Sérum monospécifique	DILUTIONS						
		1/25	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600
<i>Brucella</i> brucei 19	anti-melitensis	—	—	—	—	—	—	—
S 19/PT/34	•	++	++	+	—	—	—	—
S 19/ <i>E. coli</i> α /30	•	++	++	—	—	—	—	—
S 19/ <i>E. coli</i> β /30	•	++	++	—	—	—	—	—
<i>Brucella</i> brucei 19	anti-abortus	+++	+++	+++	+++	+++	++	—
S 19/PT/30	•	+++	+++	+++	+++	++	—	—
S 19/ <i>E. coli</i> α /30	•	+++	+++	+++	+++	+	—	—
S 19/ <i>E. coli</i> β /30	•	+++	+++	+++	+++	+	—	—

Nous voyons donc que les souches 19 cultivées sur les milieux hétérologues montrent une diminution des titres d'agglutination avec le sérum homologue anti-abortus (de 1/800 à 1/400 - 1/200).

En même temps, ces souches passées sur milieu hétérologue et contrairement à la souche de départ 19 acquièrent la faculté d'agglutiner sous l'influence du sérum anti-melitensis, au titre 1/50, 1/100.

Nous avons continué des essais analogues en nous appuyant sur les recherches de RYDZAK, déjà décrites, concernant les phénomènes de la paraallergie sous l'influence de la culture sur les substrats de métabolites de la *Brucella*. Cette fois-ci, on sensibilisait les animaux de laboratoire à l'action de la tularine U sous l'influence d'une infection par *P. tularensis*. Les animaux sensibilisés montraient des réactions allergiques cutanées nettes avec la tularine, qui se manifestaient par une infiltration et une rougeur.

Simultanément, on appliquait aux mêmes animaux de laboratoire des injections intracutanées d'allergène préparé de la même manière que la tularine U, de la souche *Br. abortus* 19 cultivée sur le

TABLEAU VIII

Allergènes		24 h.	48 h.	72 h.
Tularine U	Rougeur Infiltration	25 mm 5 mm	30 mm 10 mm	30 mm 15 mm
S 19/PT/30	Rougeur Infiltration	20 mm 5 mm	30 mm 7.5 mm	30 mm 10 mm

Nous observons donc ici de même les phénomènes de parallélisme entre la tularine U et l'allergène analogique, préparé de la souche 19/PT/30, bien que les symptômes de la réaction avec la tularine soient beaucoup plus distincts et plus importants.

En réunissant les méthodes et les résultats des recherches présentées ici, concernant les résultats des épreuves sur la variabilité expérimentale de certaines particularités biochimiques et antigénosérologiques de différentes variétés de *Brucella* on peut constater que :

- les possibilités expérimentales de changements de certaines particularités réussissent mieux quand elles concernent les liaisons entre les variétés de *Brucella* (LISBONNE, PARNAS).
 - Ces épreuves réussissent aussi, mais dans un plus faible degré, quand les combinaisons de la croissance croisée sur les substrats hétérologues concernant des bactéries d'espèces apparentées comme par exemple *Brucella brucei* et *Pasteurella tularensis*, de même que les bactéries qui possèdent une parenté antigène accidentelle malgré le genre différent (*Brucella*, *Proteus* OX 19).
 - Les épreuves visant au changement des particularités ne réussissent pas lorsqu'elles concernent des espèces de bactéries complètement étrangères, comme *Brucella* et *E. coli*. En conséquence de l'influence mutuelle des substrats hétérologues, soit dans les conditions de la parabiose, soit dans la culture sur milieu métabolique, ont lieu des changements des particularité biochimiques dans la production de H₂S l'activité des ferments, la sensibilité aux colorants d'aniline, etc... ainsi que des particularités sérologiques. On observa des changements allergènes se manifestant par le rapprochement antigénique de ces particularités vers les particularités des bactéries desquelles était fait le substrat de culture.
- Les phénomènes ici décrits ont lieu probablement sous l'influence de l'acide desoxyribonucléique (D.N.A.), qui se trouve dans

le substrat employé comme milieu de culture. Nous allons nous efforcer d'isoler le D.N.A. des substrats que nous possédons; nous réussissons alors sans doute à provoquer les changements décrits ici sous l'influence de D.N.A.

7. — Les souches atypiques et intermédiaires de notre collection

RENOUX (1954) observe avec raison que ces phénomènes de la variabilité ont probablement lieu dans les conditions des systèmes biocentriques dans la nature et constituent les moteurs de la grande variabilité et plasticité des *Brucella*. RENOUX figure de grandes possibilités de formation de variétés et de sous-variétés de la *Brucella* dans ce domaine. Il représente 64 variétés possibles de *Brucella* que l'on pourrait obtenir dans les épreuves expérimentales et dans les conditions naturelles.

Les recherches de A. CHODKOWSKI et J. PARNAS (1953-1956) démontrèrent que des variétés et sous-variétés de la *Brucella* différentes des normes de HUDDLESON, adoptées par les types de *Brucella*, apparaissent aussi dans notre collection indigène de *Brucella*.

En nous rapportant au tableau élaboré par RENOUX (1954), nous avons réuni dans le tableau N° IX, toutes les souches atypiques de notre collection.

On marqua ici toutes les particularités biochimiques bactériostatiques et sérologiques s'écartant de la norme. On effectua ensuite encore une épreuve. On soumit une fois encore toutes les souches de *Brucella* de notre musée à l'analyse dans le but de trouver une réponse à la question : quels changements subirent ces souches en comparaison avec les résultats que nous en avons obtenu en 1953 (près de trois ans auparavant). Sur les tableaux n° X et XI, nous présentons seulement ces souches, qui subirent un changement, en présentant les résultats des années 1953 et 1957 pour les comparer et en omettant les souches, qui n'avaient pas varié.

8. — Caractérisation des souches de *Brucella* à l'aide du phage anti-*Brucella*

Grâce aux précieux travaux de l'Union Soviétique (DROZEWKI-NA, WIERSZILOWA, OSTROWSKAJA et d'autres) ainsi qu'en France (ROUX), on obtint les phages spécifiques anti-*Brucella*. Ces phages furent obtenus du fumier des étables et des bergeries atteintes de *Brucellose*. On constata de même des phages dans les anciennes cultures de *Brucella* conservées au Laboratoire. D'après DROZEWKI-NA, ces phages sont la cause de la grande variabilité des colonies de *Brucella*, de la morphologie de ces bacilles et de leurs qualités antigènes. Les phages anti-*Brucella* sont appliquées dans les recherches bactériologiques. L'addition du sérum spécifique anti-phage aux milieux neutralise l'action du phage accompagnant les *Brucella* (ensemencements de sang, de la moelle osseuse, des foetus avortés,

VARIABILITÉ DES BRUCELLA

TABEAU X

NOM DE LA SOUCHE	N° de la souche	PARTICULARITES BIOCHIMIQUES				PARTICULARITES BACTERIOSTATIQUES			
		Production de H2S		Hydrolyse de l'urée en min.		1953		1957	
		1953	1957	1953	1957	fuchs.	thion.	fuchs.	thion.
<i>Br. bruc. abortus</i>	4	4	5	34	12	+++	—	+++	—
"	6	4	8	3	6	++	—	—	+
"	12	3	3	31	12	+++	—	+++	—
"	29	2	—	25	18	+++	—	+++	—
"	36	2	8	76	50	+++	—	+++	—
"	41	2	6	45	10	+++	—	+++	—
"	42	3	4	71	15	+++	—	+++	—
"	48	4	—	58	52	+++	+++	+++	—
"	52	5	6	73	74	+++	—	+++	+++
"	53	5	5	48	48	+++	—	++	+++
"	54	3	6	80	50	+++	—	+++	+++
"	58	4	—	90	90	+++	—	—	—
"	59	4	—	95	95	+++	—	—	—
"	60	5	2	90	40	+++	—	+++	—
"	61	4	4	95	50	+++	—	+	+
<i>Br. bruc. suis</i>	62	5	6	2	2	+++	+	—	+
<i>Br. bruc. abortus</i>	63	4	6	2	2	+++	—	—	—
"	68	4	4	120	90	+++	—	—	—
"	72	1	4	60	65	+++	—	+++	—
"	77	2	7	36	60	+++	—	+	—
<i>Br. bruc. suis</i>	78	3	7	2	8	—	++	—	++
"	79	5	6	2	15	—	+++	—	+++
<i>Br. bruc. abortus</i>	80	4	5	55	70	+++	+++	+	—
<i>Br. bruc. suis</i>	81	5	66	3	3	+++	+	—	—
<i>Br. bruc. melitensis</i>	82	5	6	3	4	+++	+++	—	±
<i>Br. bruc. abortus</i>	83	5	5	3	43	+++	—	+++	—
<i>Br. bruc. suis</i>	92	4	7	28	11	+++	+++	—	+
<i>Br. bruc. abortus</i>	94	3	6	3	3	+++	—	—	+
<i>Br. bruc. abortus</i>	95	3	6	3	3	+++	—	—	+
<i>Br. bruc. suis</i>	96	3	6	3	2	+++	++	—	+
"	107	4	4	3	3	—	+	—	±
"	117	—	—	2	2	—	+++	+	±
"	118	—	—	2	3	—	+++	—	—
"	120	4	3	150	120	+++	—	+++	—
"	147	4	3	58	55	+++	—	—	—
"	151	4	3	34	22	+++	—	—	—
"	159	4	5	85	25	+++	—	—	—
"	160	4	—	60	60	+++	—	+	+
"	163	8	4	50	50	+++	+++	+++	—
"	180	5	—	13	10	+	+	+	+
"	181	5	2	22	17	+	—	+	+
"	183	2	7	12	15	+	+	+	+
<i>Br. bruc. suis</i>	184	—	3	28	18	—	+++	—	+++
"	185	—	—	23	4	—	+++	—	+++
<i>Br. bruc. abortus</i>	112	2	7	94	94	+++	—	+++	—
"	109	1	5	94	65	+++	—	+++	—

TABLEAU XI

N° DES SOUCHES	1953						1958					
	Sérum monospécifique anti						Sérum monospécifique anti					
	abortus-suis			melitensis			abortus-suis			melitensis		
	1/25	1/50	1/100	1/25	1/50	1/100	1/25	1/50	1/100	1/25	1/50	1/100
10	++	+++	+	-	-	-	+++	+++	+++	+++	++	-
155	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	++	-
181	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+	-	-
183	+++	+++	+++	+	-	-	+++	+++	+++	+++	++	-
204	±	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+	-
203	+	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
206	++	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	++	-
213	++	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++

192

ARCHIVES DE L'INSTITUT PASTEUR DE TUNIS

VARIABILITÉ DES BRUCELLA

193

TABLEAU XII

Résultat des recherches avec le phage antibrucella
sur les souches de notre collection : 146 souches

	Souches		Action du phage « Tbilisi »
I. <i>Br. brucei</i>	var. <i>melitensis</i>	2 souches	—
II.	var. <i>suis</i>	30 souches	—
III.	var. <i>abortus</i>	100 souches	+
IV.	var. <i>abortus</i>	14 souches	—

Les 14 souches, insensibles à l'action de ce phage, portent les n° : 6, 7, 11, 12, 20, 24, 43, 63, 92, 102, 124, 139, 157, 180 dans notre collection. Le Tableau XIII résume les caractéristiques de neuf d'entre elles.

TABLEAU XIII

	N° de la souche	PARTICULARITES BIOCHIMIQUES				PARTICULARITES BACTERIOSTATIQUES				Sensi- bilité au phage
		Production de H ₂ S		Décomposi- tion de l'urée en min.		1953		1957		
		1953	1957	1953	1957	Croissance sur fuch- sine	thio- nine	Croissance sur fuch- sine	thio- nine	
<i>Br. brucei</i> v. <i>abortus</i>	11	4	4	24	25	+++	—	+++	—	—
<i>Br. brucei</i> v. <i>abortus</i>	12	3	3	31	12	+++	—	+++	—	—
<i>Br. brucei</i> v. <i>abortus</i>	20	4	3	32	17	+++	—	+++	—	—
<i>Br. brucei</i> v. <i>abortus</i>	24	4	5	32	27	+++	—	+++	—	—
<i>Br. brucei</i> v. <i>abortus</i>	102	4	4	85	78	+++	—	+++	—	—
<i>Br. brucei</i> v. <i>abortus</i>	124	5	5	25	25	+++	—	+++	—	—
<i>Br. brucei</i> v. <i>abortus</i>	139	4	3	55	50	+++	—	+++	—	—
<i>Br. brucei</i> v. <i>abortus</i>	180	8	—	13	10	+	+	+	+	—

du lait) et favorise une meilleure croissance des colonies de *Brucella*.

Evidemment, dès l'obtention du phage anti-*Brucella* on s'occupa de la question de la différenciation des variétés de la *Brucella* à l'aide du phage comme complément aux méthodes classiques de HUDDLESON.

Les recherches de WIERSZILOWA et OSTROWSKAJA démontrèrent que le phage anti-*Brucella*, obtenu du fumier dans une des fermes de la Grusie agit lytiquement sur la variété *abortus*, tandis qu'il n'agit pas sur les variétés *suis* et *melitensis*. Le résultat de cette épreuve est très intéressant, car nous gagnons, grâce à cette méthode, une nouvelle manière de différenciation de la variété *abortus* de la variété *suis*, ce qui ne réussit pas à l'analyse sérologique.

Dans les cadres de notre étroite collaboration avec la section de Brucellose de l'Institut Gamaleia de l'Académie des Sciences Médicales de l'Union Soviétique à Moscou, nous avons reçu un phage du Professeur Dr WIERSZILOWA, pour lequel nous lui exprimons notre gratitude.

Nous avons utilisé ce phage pour la première fois en le faisant agir sur les souches se comportant de façon typique dans tous les tests : de la variété *abortus* (24) *suis* (1330), *melitensis* (M. 16).

Nous constatâmes en effet que le phage anti-*Brucella* que nous avons désigné par le symbole « Tbilisi » agit lytiquement seulement sur la variété *abortus* et provoque dans la culture sur milieu stable des « calvities » typiques, tandis qu'il n'agit pas sur les variétés *suis* et *melitensis*. Puisque la variété *suis* employée pour l'expérience est une souche américaine, nous avons fait des épreuves semblables avec nos propres souches de la variété *suis*, correspondant à la variété danoise. Nous avons constaté que toutes ces souches se comportent de la même manière que la souche américaine sous le rapport phagolytique. L'expérience suivante consistait dans l'examen de l'activité du phage « Tbilisi » sur 146 souches de notre collection de *Brucella*. Les résultats sont représentés sur les tableaux XII et XIII. Nous avons remarqué alors un fait intéressant : les souches de *Brucella brucei* variété *abortus* déterminées à l'aide de la méthode de HUDDLESON, qui se rapprochaient par quelque particularité de la variété *suis* ou *melitensis* ne sont pas sujettes à la lyse sous l'influence du phage. Nous voyons donc un « parallélisme » net entre les particularités biochimiques et antigéniques et la sensibilité à l'action du phage. On a donc une base pour utiliser le bactériophage en vue de la différenciation des souches atypiques de la variété *abortus*.

Les colonies varient très sensiblement sous l'influence du phage. Sur la photographie n° 1, nous voyons les colonies normales de *Brucella* colorées par la méthode de Braun (violet cristallisé 1/2000). Les colonies sont grandes, rondes et colorées en jaune. Ce sont les colonies typiques S. Sur la photographie n° 2, on voit la même souche de *Brucella*, mais sous l'influence du phage. Après la coloration de

VARIABILITÉ DES BRUCELLA

195

la colonie à l'aide de la méthode de Braun, on voit un grand changement. Les colonies sont granuleuses, aux bords irréguliers, colorées en violet sur fond jaune, avec une radiation typique. Ce sont les variants intermédiaires R-S.

Sur la photographie n° 3, on voit les colonies de *Brucella* colorées par la méthode de Henry. Ce sont des colonies typiques S. Sur la photographie n° 4, on voit la même souche de *Brucella*, mais sous l'action du phage. Les colonies examinées d'après la méthode de Henry ne rappellent en aucune façon les types de colonies de *Brucella*, décrits jusqu'à présent. Les colonies sont très grandes, plates, granuleuses, les bords des colonies se composent de nombreuses colonies secondaires. La photographie n° 5 montre les colonies de *Brucella* examinées à l'aide de la méthode de Henry. Sous l'influence du phage, de nouvelles colonies ont apparu. Ce sont des colonies plates, très granuleuses.

Ces expériences montrent que le phage antibrucella est un moteur puissant de variabilité. Il est vraisemblable que tous les types de colonies de *Brucella*, décrits jusqu'à présent sont en relation plus ou moins grande avec l'activité du phage. Ceci ouvre de nouveaux horizons méthodologiques à la génétique des *Brucella*.

Jusqu'à présent, nous avons opéré à l'aide du phage de l'Institut Gamalei à Moscou. A présent, nous possédons déjà 10 phages propres isolés des cultures de collection. Les résultats de nos expériences se trouveront dans un prochain rapport.

9. — Conclusions

I. Nos recherches sur les variétés de *Brucella* isolées en Pologne démontrèrent qu'il y avait parmi les souches indigènes examinées par nous :

- des souches typiques *abortus*
- " atypiques *abortus*
- " typiques *suis*
- " atypiques *suis* (danoises)
- " typiques *melitensis*
- " atypiques *melitensis*.

Ces données éclairent les conditions épizootologiques et épidémiologiques (A. CHODKOWSKI, J. PARNAS).

II. Nos observations concernant la variabilité et la signification des particularités biochimiques, sérologiques et bactériostatiques de *Brucella* sont d'accord avec les recherches et opinions de G. RENOUX. Nous ajouterons ici que cet éminent investigateur (Institut Pasteur — Tunis, O.M.S.) examina également les souches de notre collection : les résultats s'accordent avec les nôtres.

III. Les expériences personnelles citées ici s'accordent avec les recherches expérimentales de LISBONNE et d'autres investigateurs sur

VARIABILITÉ DES BRUCELLA

197

BIBLIOGRAPHIE

- RENOUX G., AMARASINGHE A., SACQUET E. — *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 1955, 32, 375.
- ZDRODOWSKI P., BRAUN A., WOSKRESSENSKI B. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, 45, 798.
- WILSON G. S. — *J. comp. Path. Therap.* 1936, 49, 338.
- RENOUX G., CARRERE L., QUATREFAGES H. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, 88, 277.
- LISBONNE M., NEGRE L., SEIGNEURIN R., ROMAN G. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1938, 61, 822.
- BRAUN W., OGLESBY G. — *Proc. Soc. Exp. Biol.* 1954, 86, 757.
- CHODROWSKI A., PARNAS J. — *Annales U. M. C. S.* 1955, 11, 1.
- CHODKOWSKI A., PARNAS J. — *Microbiologia Med. Dosw.* (sous presse).
- RYDZAK J. — *Annales U. M. C. S.* 1949, VI, 10, 185.
- FRENDZEL J., SZYMANOWSKI Z. — *Med. Dosw. i Spol.* 1931, 7-8.
- DROZEWKINA M. S. — *Trudy Rostowskovo na Donu protiv. Inst.* 1956, n. 268.
- PARNAS J. — *Acta Microbiol. Polonica* 1956, 1-2, 45.
- PARNAS J. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, 89, 282.
- VERSHILOVA P. A., OSTROVSKAIA M. — *Communications personnelles*, 1956, 1957.

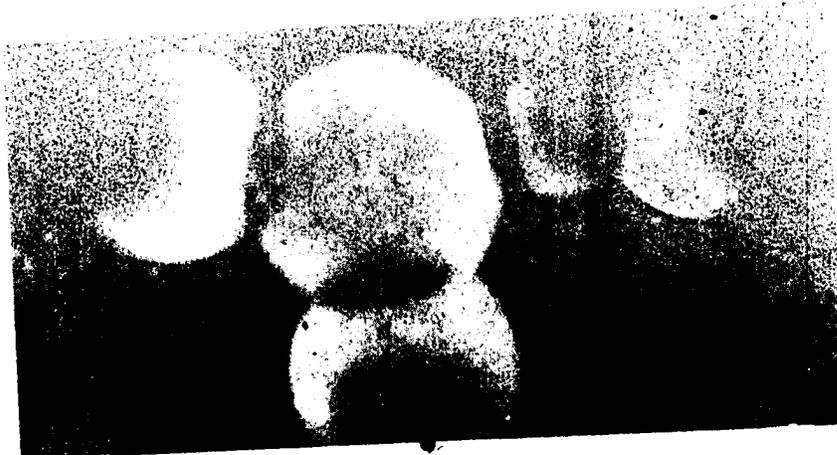


Photo 1 : Colonies normales de Brucella. Coloration de Braun.



Photo 2 : Colonies de Brucella soumises à l'action d'un phage. Coloration de Braun.

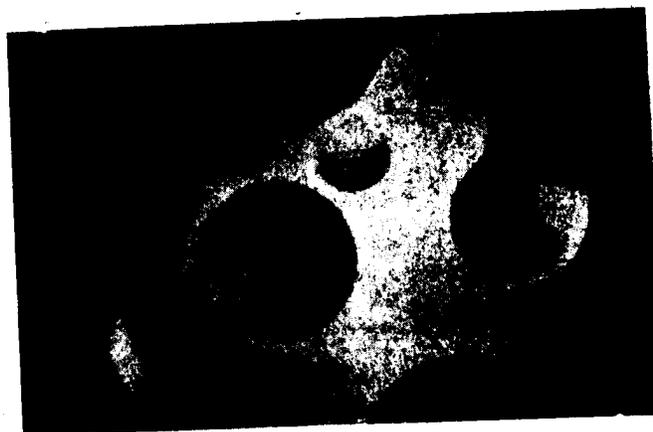


Photo 3 : Colonies typiques S de Brucella. Coloration de Henry.



Photo 4 : Colonies de *Brucella* soumises à l'action d'un phage. Coloration de Henry.



Photo 5 : Colonies secondaires. Coloration de Henry.

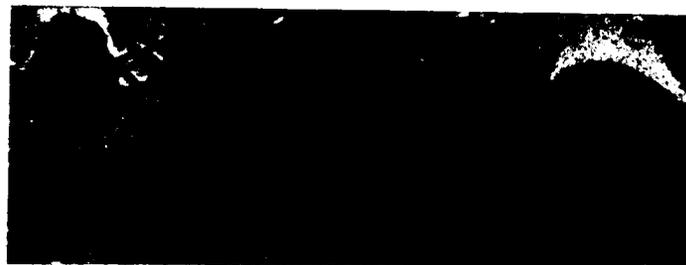


Photo 6 : *Brucella brucei* au microscope électronique. Gr \times 18 000.



Photo 7 : *Brucella brucei* et phage
« Tbilisi ». Gr. × 16 000.



Photo 8 : Phage anti-*Brucella* « Tbilisi ».
Gr. × 16 000.

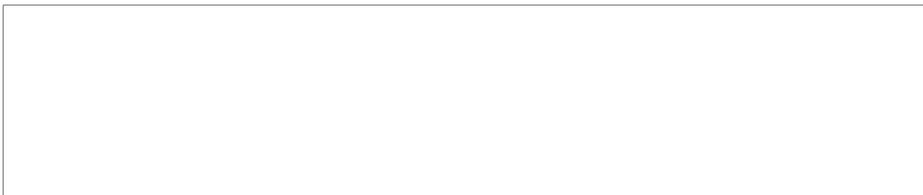


Photo 9 : *Brucella brucei* et phage « Tbilisi ». Gr. × 16 000.

EXAMENS GÉNÉTIQUES BIOMÉTRIQUES

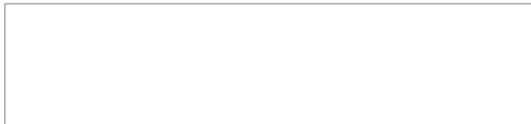
COLLECTEUR	en jrs	Créase	Détection de la variété						Crois. sur milieu		Détection de la variété						
			abortus		suis		moltensis		T	F	abortus		nésé		moltensis		
			(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)			(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	
45	5	4			+				-	-							
48	4	52	+						+++	+++							+
62	5	2			+				+++	+							+
63/28	4	2			+				+++	-	+						
77/72	2	18	+						+++	-	+						
78/87	8	2			+				-	++				+			
81/173	5	3			+				+++	+++							+
82/837	4	2			+				+++	++							+
86	3	3			+				+++	++							+
118/3808/47	5	67	+						+++	++							+
120/1/3774/52	4	150	+						+++	++							+
126/888	5	49	+						+++		+						
127/83	+	5	150	+					+++	++							+
186/B 383	+	5	40	+					+	-	+						
196/7/56		5	2	+						+				+			
/363/53		8	7			+				+				+			
284/383/53		6	8			+				+				+			
208/349/53		8	7			+				+				+			
213/419/53		8	7			+				+				+			
176/36			60			+		+	+		+						
177/6605		5	17	+					+	+							+
178/7274		5	47	+					+	+							+
180/5335	+	5	13	+					+	+							+
183/1835	+	2	12	+					+	+							+
221/4086		7	25	+					++	±		+					
		7	78	-						-		+					
222/141/a		7	65	+					+++	-	+						
224/4010		7	50	+					+++		+						+
228/253/57		7	31	+					+++	++							+

(1) variété typique — (2) variété atypique — 28 ab



25X1

BULLETIN DE L'ACADEMIE
POLONAISE DES SCIENCES
Et II - Vol. VI, No. 5, 1956
Societe des sciences biologiques



25X1

MICROBIOLOGY

Anti-Brucella brucei Phage

by

J. PARNAS, A. FELTYNOWSKI and W. BULIKOWSKI

Presented by E. MIKULASZEK on March 3, 1956

The anti-*Brucella* phage has been discovered and described only recently, in result of research work carried out by Russian workers, namely by Drozhevskina, Institute of Microbiology and Epidemiology, Rostov on Don (1953), and Vyershilova and Ostrovskina, Gamaleia Institute, Moscow (1956). The workers referred to isolated the anti-*Brucella* phage from manure collected in brucellosis infected farms, as well as *Brucella* cultures from old collections.

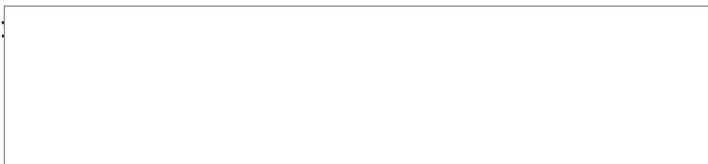
Drozhevskina showed the anti-*Brucella* phage to have a potent effect on *Brucella* dissociation. This, by implicating a phage-induced mechanism of variability, has greatly contributed to our theoretical knowledge of the immense dissociation range described by Huddleson, Henry, Braun, Hadley, Zdrodowski, and by the Polish author Parnas. Studies on the anti-*Brucella* phage are in progress also in the World Health Organization at Montpellier (Roux) and Pickett (USA).

We are greatly indebted to Professor Dr. Vyershilova and Dr. Ostrovskaya for making available to us in Moscow the anti-*Brucella* phage grown in the Gamaleia Institute. This phage, referred to further on as "Tbilisi", was the subject of the studies under report. The studies extend the scope of existing work, and the electron micrographs presented are the first ones in world literature relating to anti-*Brucella* phage. At the present time, we have 14 own anti-*Brucella* phages, isolated from museum cultures of *Brucella*.

With our own collection of phages available for experiments, we investigated the following aspects:

- a) morphology of the phage, with the aid of an electron microscope;
- b) influence of the phages on dissociation of *Brucella*;
- c) influence of the phages on various types of *Brucella*.

[201]



25X1

Methods

not The cultures of the phage received were not pure. Attempts at eliminating bacterial contaminations by using Seitz filters had a notable attenuating effect on the phage, whose original titer was 3×10^8 . Next, we tried to purify the phage with the aid of penicillin, which was shown in our earlier experiments to have no bacteriostatic effects on the gram-negative *Brucella*. However, when penicillin was added to phage suspensions (500, 1000 and 2000 units per 1 ml.), it proved to have bacteriostatic effects on less virulent strains, but almost no effect on highly virulent strains of the *melitensis* varieties of *Brucella*. This phenomenon is now being further explored, since it may prove of value in differentiating virulent *melitensis* varieties. Subsequent experiments demonstrated that pure suspensions of the phage can be obtained by adding chloroform to the culture, as well as by filtration in alkaline environment. The pure phage obtained in this manner was grown on young, six-hour cultures of *Brucella*. The phage obtained proved very active toward thick agar cultures of the bovis variety of *Brucella*, but had no effect on cultures of the *melitensis* and *suis* varieties. In investigating dissociation of *Brucella* under the effects of the phage, we used the method of Henry and Braun. Normal *Brucella brucei* cultures and young, six-hour cultures of *Brucella* were centrifugated at a rate of 18 000 revolutions per minute, suitably washed with physiological saline, and subsequently suspended in distilled water. The preparations obtained were examined in the electron microscopical laboratory of the State Institute of Hygiene, Warsaw.

Results of investigations

The phage, purified and invigorated on 140 *Brucella* strains from our own collection, proved to have potent lytic effects on bovis variety strains, and no effects at all on the *melitensis* and *suis* varieties. It was also inactive toward atypical or intermediate strains of the bovis variety.

The anti-*Brucella* phage was also found to be very powerful as an agent inducing dissociation of *Brucella*. Treatment with the phage causes rapid dissociation of pure *S* type *Brucella*, affording *R* type and a wide range of intermediate types.

Electron microscopy revealed the phage in the form of elementary bodies, globular in shape and from 60 to 80 millimicrons in size. The phage has no flagellum. The electron micrographs show normal *Brucella* cells magnified roughly 12 000 times. These are globular or obovoid atrophic cells destitute of a membrane. When attacked by the phage, the same *Brucella* cells show in the first stage a notable power of adsorption, revealed by accumulations of the phage around the cells. In the next stage, the cell surface shows characteristic convexities and erosions due to the lytic action. Also cells close to the dissolution stage may be seen.



Fig. 1. *Brucella* colonies, type *S*. Examined after Braun's method; they are round in shape, of a vivid yellow, have regular outlines, a smooth and convex surface. When treated with the phage, the strain produces different colonies, shown in Fig. 2

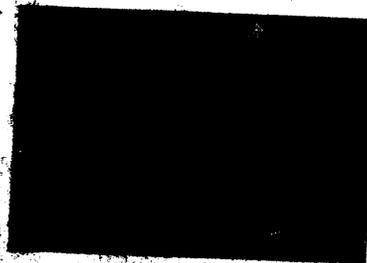


Fig. 2. *Brucella* colonies of the same strain treated with the phage. Stained after Braun. Colonies are flat with irregular margins and a surface of violet colour, appearing as M against the background of another yellow layer. There is some evidence of small satellite colonies. These are colonies of the mixed R-S type

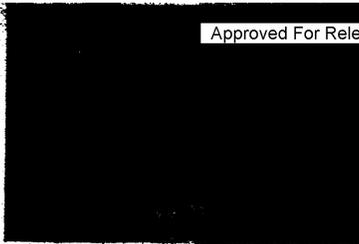


Fig. 3



Fig. 4

Figs. 3 and 4. Colonies of *S* type, examined after Henny. They are round and smooth. When treated with the phage, the same strain produces totally different colonies. As will be noted, the colonies are rough, granular, and have erose margins with very minute secondary colonies.

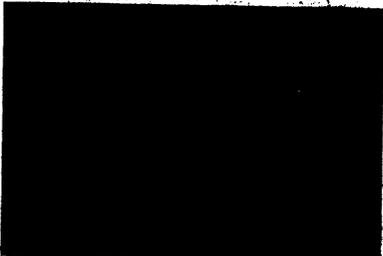


Fig. 5. *Brucella* strain modified by the phage. Colonies are rough and granular. The experiments show the vast range of variations of *Brucella* under the effect of the phage.

Fig. 6. *Brucella* strain



Fig. 7. *Brucella* strain

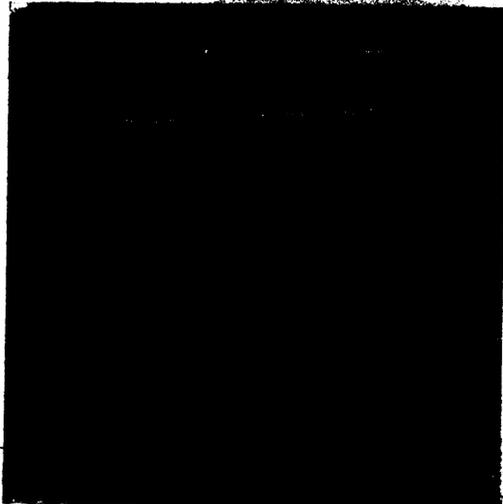


Fig. 8. *Brucella* strain

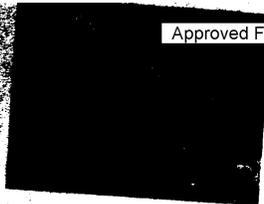


Fig. 9. *Brucella brucei* + phage, $\pm 12,000 \times$



Fig. 10. Anti-*Brucella* phage, $\pm 12,000 \times$

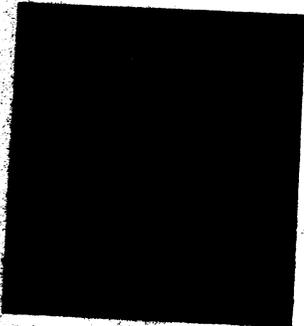


Fig. 11. This shows the results obtained from investigations conducted with our own phages (20). On the upper left plate: an atypical bovis strain of *Brucella*. Some of the phages exert a potent effect, and some a weak one, if any. On the upper right plate: a typical bovis strain of *Brucella*, to which all of our own phages have an extremely potent effect. Lower left plate: a multivariant strain of *Brucella*, completely immune to the action of the entire collection of our own phages. Lower right plate: typical bovis strain of *Brucella*, highly susceptible to most of our own phages.

Investigations involving our own phages afforded the following results: phage XIV acts on all *Brucella* strains of the bovis type, except for bovis strains Nos. 117, 117 and 28. The Typical *Brucella* strains: suis No. 1330 and melitensis No. M 16, were immune to the phage, whereas the other strains of the suis type were susceptible to it. Phages Nos. XI, IV/10, XI^a, VIII, VII, XIV, VIII^a, VI/10, VII^a, IX, II and I, also from our own collection, showed very much the same behaviour. Strain No. XIV^a of the phage occupies a special position; it acted only on some strains of *Brucella*. It seems possible that further investigations may lead to phage-typing of *Brucella* strains.

Further photographs bring proof of phage-induced mutation of *Brucella* colonies.

DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY, SCHOOL OF MEDICINE, LUBLIN
DEPARTMENT OF ANTHROPOZOONOSES, INSTITUTE OF OCCUPATIONAL MEDICINE
AND RURAL HYGIENE, LUBLIN